

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 07 APR 2004	
WIPO	PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen: 103 02 422.0

Anmeldetag: 21. Januar 2003

Anmelder/Inhaber: responsif GmbH, 91056 Erlangen/DE

Erstanmelder: november Aktiengesellschaft
Gesellschaft für Molekulare Medizin,
91056 Erlangen/DE

Bezeichnung: Medikament und Verwendung zur Tumorthherapie

IPC: A 61 K 38/19

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 6. Februar 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

13.02.2004

Medikament und Verwendung zur Tumorthherapie

Die Erfindung betrifft ein Medikament und eine Verwendung zur
5 Tumorthherapie.

Aus der DE 195 41 284 A1 ist es bekannt, dass Annexin V sich
zur Therapie von Tumoren eignet. Das wird darauf zurückge-
führt, dass durch die Gabe von Annexin V die Phosphatidylse-
10 rin abhängige Phagozytose beeinflussbar ist.

Nach dem Stand der Technik ist kein Medikament bekannt, dass
eine wirksame Tumorthherapie gewährleistet.

15 Aufgabe der Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand
der Technik zu beseitigen. Es sollen insbesondere ein Medi-
kament und eine Verwendung zur Tumorthherapie angegeben wer-
den.

20 Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 15
gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindungen ergeben
sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 14 und 16 bis 30.

Nach Maßgabe der Erfindung wird ein Medikament zur Tumorthe-
25 rapie vorgeschlagen, bei dem in einer wirksamen Konzentration
ein erstes und ein zweites Molekül enthalten sind, wobei das
erste Molekül

a1) Annexin V oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül,
30
oder

a2) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weit
gehend ähnlichen Moleküls ist,
35

und wobei das zweite Molekül

b1) ein Cytokin oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül

5 oder

b2) ein wirksames Fragment eines Cytokin oder des damit weit gehend ähnlichen Moleküls ist.

10 Es hat sich überraschenderweise gezeigt, dass eine kombinierte Verabreichung von Annexin V bzw. gleichwirkender ähnlicher Moleküle und eines Cytokins oder eines damit gleichwirkenden ähnlichen Moleküls sich hervorragend zur Therapie von Tumoren eignet. Es wird innerhalb kurzer Zeit, z. B. innerhalb weniger Tage, eine Verringerung der Tumormasse bis hin zum völligen Verschwinden des Tumors beobachtet.

Das vorgeschlagene Medikament ist auch dann noch wirksam, wenn das erste Molekül lediglich ein mit Annexin V oder dem Cytokin ähnliches Molekül oder ein wirksames Fragment von Annexin V bzw. dem Cytokin oder ein mit dem Fragment weit gehend ähnliches Molekül umfasst. - Ein Fragment ist insbesondere dann "wirksam", wenn es in Kombination mit dem jeweils anderen Molekül ein Abschmelzen eines behandelten Tumors bewirkt. Unter dem Begriff "ähnliche Moleküle" werden solche Moleküle verstanden, welche zu einem gewissen Grad eine Identität mit Annexin V bzw. dem Cytokin aufweisen und in Kombination mit dem jeweils anderen Molekül wirksam sind.

30 Unter dem Begriff "Cytokin" wird ein Protein verstanden, das von einer Zelle freigesetzt wird und das Verhalten anderer Zellen beeinflusst.

Nach einer Ausgestaltung kann eine Aminosäuresequenz des ersten Moleküls der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1 oder Nr.

2 entsprechen oder zumindest zu 50%, vorzugsweise zumindest zu 60%, besonders bevorzugt zumindest zu 70%, ganz besonders bevorzugt zumindest zu 80%, identisch damit sein. Die Ermittlung der Identität kann erfolgen z.B. nach dem Verfahren von
5 Altschul, S. F. et al. (1997), Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

10 Unter dem Begriff "Identität" wird vorliegend das Ausmaß verstanden, zu welchem zwei Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen invariant sind.

Bei der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 2 handelt es sich um eine N-terminale Deletionsmutante der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1, der die acht Aminosäuren 3 bis 10, das heißt
15 die Aminosäuren Lys Tyr Thr Arg Gly Thr Val Thr fehlen.

Zweckmäßigerweise ist das Annexin V nicht-humanes Annexin V, vorzugsweise das Annexin V des Huhns. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz des Annexin V des Huhns mit menschlichem Annexin V ergibt, dass beide Proteine zu 78,2 % identisch sind.
20 Das Annexin V des Huhnes besitzt einen theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 5,60, während menschliches Annexin V einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 4,94 aufweist. Die Sequenz des menschlichen Annexins kann unter der Zugriffsnummer PO8756 in der Protein Datenbank "SWISS-PROT" abgerufen werden.
25

Das Cytokin kann aus der folgenden Gruppe ausgewählt sein: Interleukin-2, Interleukin-6, Interleukin-7, Interleukin-12
30 oder GM-CSF.

Es hat sich als besonders wirkungsvoll erwiesen, dass in einer Verabreichung 0,05 bis 0,5 mg/g Tumorgewicht an erstem Molekül in einer Verabreichungseinheit enthalten sind. Dabei kann eine Verabreichungseinheit 0,1 bis 2,5 mg, vorzugsweise 0,5 bis
35

2,0 mg, an erstem Molekül enthalten. Sie enthält vorzugsweise ferner 50.000 bis 1.000.000 International Units, vorzugsweise 300.000 bis 750.000 International Units an zweitem Molekül. Ferner sind das erste und das zweite Molekül zweckmäßigerweise in einer Injektionsflüssigkeit, vorzugsweise einer gepufferten Kochsalzlösung, aufgenommen. Das Volumen der Injektionsflüssigkeit kann 0,5 bis 50 ml, vorzugsweise 1 bis 10 ml, betragen.

Das Medikament kann neben dem Wirkstoff weiterhin menschliche Tumorzellen umfassen, wobei die Tumorzellen apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen sein können. Die Apoptose und/oder Nekrose der Tumorzellen kann dabei spontan aufgetreten oder induziert worden sein. Als Induktoren für die Apoptose und/oder Nekrose kommen Bestrahlung der Tumorzellen ex-vivo oder in-vivo oder ein Inkontaktbringen der Tumorzellen mit Zytostatika in Betracht. Es eignen sich in diesem Zusammenhang insbesondere Chemikalien wie H_2O_2 oder Staurosporin, Medikamente wie Kortikosteroide, Chemotherapeutika wie Doxorubicin, cis-Platin oder Hydroxy-Harnstoff, UVB- und UVC-Strahlung, sowie β -, γ - oder Röntgenstrahlung. Vorzugsweise werden die apoptotischen und/oder nekrotischen Tumorzellen des zu behandelnden Tumors mit dem Wirkstoff in Kontakt gebracht.

Nach weiterer Maßgabe der Erfindung ist eine Verwendung eines ersten Moleküls, nämlich

a1) Annexin V oder eines damit weit gehend ähnlichen Moleküls,

oder

a2) eines wirksamen Fragments von Annexin V oder eines damit weit gehend ähnlichen Moleküls,

in Kombination mit einem zweiten Molekül, nämlich

5 b1) Interleukin-2 oder einem damit weit gehend ähnlichen Molekül

oder

10 b2) einem wirksamen Fragment von Interleukin-2 oder des damit weit gehend ähnlichen Moleküls,

zur Tumorthherapie vorgesehen.

15 Als besonders wirkungsvoll hat sich die Verwendung zur Behandlung von Tumorergüssen erwiesen. Bei dem Tumor kann es sich insbesondere um ein Mammakarzinom handeln.

20 Wegen der vorteilhaften Ausgestaltungen wird auf die vorhergehende Beschreibung verwiesen. Die darin erwähnten Merkmale können sinngemäß auch Ausgestaltungen des Medikaments sein.

Die Erfindung wird nachstehend anhand der Zeichnungen beispielhaft näher erläutert. Es zeigen:

25 Fig. 1 die Expressionskinetik von Annexin V des Huhns in transformierten Escherichia Coli BL21 (DE3) anhand einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese und

30 Fig. 2 eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proben der einzelnen Reinigungsschritte von Annexin V des Huhns aus transformierten Escherichia Coli BL21 (DE3).

35 A. Expression und Reinigung von Annexin V des Huhns

1. Expression von Annexin V des Huhns

Für die Expression von Annexin V des Huhns (cAnxV) wurde als Expressionsplasmid pDJ2-AnxV verwendet, dass neben dem cAnxV kodierenden Gen einen IPTG-induzierbaren tac-Promotor und eine Kanamycin-Resistenz-Kassette enthält. E. coli BL21 (DE3) wurde mit dem Expressionsplasmid transformiert und Expressionskinetiken durchgeführt. Dabei wurde 2xYT mit 50 mg/l Kanamycin als Nährmedium eingesetzt.

Für die Herstellung von cAnxV wurde eine 100 ml Vorkultur mit frisch transformierten E. coli BL21 (DE3) angeimpft und 8 h bei 37°C geschüttelt. 5 l Hauptkultur wurden mit 5 ml der Vorkultur versetzt und 16 bis 20 h bei 37°C geschüttelt. Auf einen Zusatz von IPTG wurde verzichtet, da in diesem Fall mit und ohne Induktion gleiche Expressionsausbeuten erzielt wurden. Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation geerntet. Die Zellfeuchtmasse betrug 16 bis 21 g. Die Expressionskinetik ist in Fig. 1 dargestellt. Die Expressionskinetiken ergaben, dass sich E. coli BL21 (DE3) auch ohne Induktion mit IPTG für eine Expression von cAnxV in dem eingesetzten Medium eignet.

2. Reinigung von Annexin V des Huhns

Die gemäß Ziff. 1 erhaltenen Zellen wurden in einem Puffer A1 (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 2 mM EDTA) resuspendiert und mittels Hochdruck (Gaulin) aufgeschlossen. Unlösliche Bestandteile der Aufschlusssuspension wurden durch hochtourige Zentrifugation entfernt. Der lösliche cAnxV-enthaltende Überstand wurde auf eine in Puffer A1 äquilibrierte Q-Sepharose-ff-Säule (Säule 1) (25 ml, amersham pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Die Elution des Zielproteins erfolgte durch einen linearen NaCl-Gradienten. Die cAnxV-enthaltenden Fraktionen wurden gepoolt und gegen einen Puffer A2 (50 mM Na-Acetat pH 5,6) dia-

lysiert. Das Dialysat wurde auf eine in A2 äquilibrierte Resource-S-Säule (Säule 2) (6 ml, amersham pharmacia, Freiburg) aufgetragen und cAnxV mit einem linearen NaCl-Gradienten eluiert. Die vereinigten cAnxV-enthaltenden Fraktionen wurden
 5 mittels Ultrafiltration (Pall Filtron, USA) konzentriert und auf eine in 10 mM Na-Phosphat pH 7,2, 140 mM NaCl äquilibrierte Superdex 200 pg-Säule (Säule 3) (amersham pharmacia, Freiburg) aufgetragen. Homogenes cAnxV wurde von der Säule eluiert. Aus 20 g Zellen (Feuchtmasse) wurden 30 mg cAnxV mit einer Reinheit, die 95 % überstieg, isoliert. Fig. 2 zeigt
 10 anhand einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese die Ergebnisse der Reinigung unter Verwendung der Säulen 1 bis 3.

Alternativ kann anstelle der angegebenen Säulen für Säule 1
 15 Q-Sepharose XL (amersham pharmacia, Freiburg), für Säule 2 SP-Sepharose HP (amersham pharmacia, Freiburg) und/oder für Säule 3 Sephacryl S200 HR (amersham pharmacia, Freiburg) verwendet werden.

20 Alternativ kann anstelle der mittels Säule 3 durchgeführten Größen-Ausschluss-Chromatografie (SEC) eine hydrophobe Säule eingesetzt werden. In diesem Fall werden die cAnxV-enthaltenden Fraktionen, die von Säule 2 eluieren, vereinigt und mit festem Ammoniumsulfat auf 1,5 M aufgestockt. Die Proteinlösung wird auf eine Phenylsepharose ff-Säule (15 ml, amersham pharmacia, Freiburg) aufgetragen und cAnxV mit einem linearen Gradienten von 1,5 bis 0 M Ammoniumsulfat eluiert.
 25

B. Tumorthherapie

30 Einem Patienten wurden in einem individuellen Heilversuch in 1 ml gepufferter Kochsalzlösung aufgenommenes Annexin V gemäß Sequenzprotokoll SEQ ID NO: 1 zusammen mit 500.000 International Units Interleukin-2 in ein etwa 2 cm großes Melanom

injiziert. Es zeigt sich bereits nach wenigen Tagen ein deutliches Abschmelzen des Melanoms.

5 Nach einem weiteren Therapieverfahren ist es auch möglich, zunächst dem Patienten Tumorzellen zu entnehmen. Die entnommenen Tumorzellen werden mechanisch dissoziiert; es wird die Zellenzahl bestimmt. Anschließend werden die Zellen mit 100 Gray bestrahlt, so dass die Tumorzellen in apoptotische oder nekrotische Tumorzellen überführt werden. 10 x 10⁶ der apoptotischen oder nekrotischen Tumorzellen werden anschließend mit einer gepufferten Kochsalzlösung gemischt, die 1 mg Annexin V gemäß Sequenzprotokoll SEQ.1 oder SEQ.2 enthält. Es erfolgt anschließend eine Inkubation. Unmittelbar vor der Injektion werden 500.000 International Units Interleukin-2 hinzugefügt. Die die apoptotischen Tumorzellen, Annexin V und Interleukin-2 enthaltende Mischung wird dann dem Patienten intradermal oder subkutan injiziert. Auch dabei wird bereits nach wenigen Tagen ein signifikantes Abschmelzen des behandelten Tumors beobachtet.

20 Zur Steigerung der Effizienz des vorgenannten Therapieverfahrens und zur Bekämpfung eines Rezidivs kann die Injektion z. B. am Tag 21, 42 und an späteren Tagen oder in der zweiten, dritten und sechsten Woche wiederholt werden.

SEQUENZPROTOKOLLE

<110> november Aktiengesellschaft Gesellschaft für Molekulare Medizin

5 <120> Medikament und Verwendung zur Tumorthherapie

<130> 411814GA

<140>

10 <141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

15

<210> 1

<211> 321

<212> PRT

<213> Gallus gallus

<300>

<400> 1

25 Met Ala Lys Tyr Thr Arg Gly Thr Val Thr Ala Phe Ser Pro Phe Asp
1 5 10 15

Ala Arg Ala Asp Ala Glu Ala Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Met Gly
20 25 30

30 Thr Asp Glu Glu Thr Ile Leu Lys Ile Leu Thr Ser Arg Asn Asn Ala
35 40 45

Gln Arg Gln Glu Ile Ala Ser Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp
50 55 60

35 Leu Val Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Thr Leu
65 70 75 80

Met Val Ser Leu Met Arg Pro Ala Arg Ile Phe Asp Ala His Ala Leu
85 90 95

Lys His Ala Ile Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu
100 105 110

45 Ile Leu Ala Ser Arg Thr Pro Ala Glu Val Gln Asn Ile Lys Gln Val
115 120 125

50 Tyr Met Gln Glu Tyr Glu Ala Asn Leu Glu Asp Lys Ile Thr Gly Glu
130 135 140

Thr Ser Gly His Phe Gln Arg Leu Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn
145 150 155 160

55 Arg Asp Pro Asp Gly Arg Val Asp Glu Ala Leu Val Glu Lys Asp Ala
165 170 175

Gln Val Leu Phe Arg Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu
180 185 190

60 Thr Phe Ile Thr Ile Leu Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Arg
195 200 205

Val Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr
 210 215 220
 5 Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asp Leu Glu Lys Leu Leu Leu Ala Val
 225 230 235 240
 Val Lys Cys Ile Arg Ser Val Pro Ala Tyr Phe Ala Glu Thr Leu Tyr
 245 250 255
 10 Tyr Ser Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp Asp Thr Leu Ile Arg Val
 260 265 270
 15 Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Leu Asp Ile Arg His Glu Phe
 275 280 285
 Arg Lys Asn Phe Ala Lys Ser Leu Tyr Gln Met Ile Gln Lys Asp Thr
 290 295 300
 Ser Gly Asp Tyr Arg Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Gly Asp Asp
 305 310 315 320
 Glu
 25
 <210> 2
 <211> 313
 <212> PRT
 30 <213> Gallus gallus
 <400> 2
 Met Ala Ala Phe Ser Pro Phe Asp Ala Arg Ala Asp Ala Glu Ala Leu
 1 5 10 15
 35 Arg Lys Ala Met Lys Gly Met Gly Thr Asp Glu Glu Thr Ile Leu Lys
 20 25 30
 Ile Leu Thr Ser Arg Asn Asn Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ala Ser Ala
 35 40 45
 Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu Val Asp Asp Leu Lys Ser Glu
 50 55 60
 45 Leu Thr Gly Lys Phe Glu Thr Leu Met Val Ser Leu Met Arg Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Ile Phe Asp Ala His Ala Leu Lys His Ala Ile Lys Gly Ala Gly
 85 90 95
 50 Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile Leu Ala Ser Arg Thr Pro Ala
 100 105 110
 Glu Val Gln Asn Ile Lys Gln Val Tyr Met Gln Glu Tyr Glu Ala Asn
 115 120 125
 55 Leu Glu Asp Lys Ile Thr Gly Glu Thr Ser Gly His Phe Gln Arg Leu
 130 135 140
 60 Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg Asp Pro Asp Gly Arg Val Asp
 145 150 155 160

	Glu	Ala	Leu	Val	Glu	Lys	Asp	Ala	Gln	Val	Leu	Phe	Arg	Ala	Gly	Glu	
					165					170					175		
5	Leu	Lys	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Thr	Phe	Ile	Thr	Ile	Leu	Gly	Thr	
				180					185					190			
	Arg	Ser	Val	Ser	His	Leu	Arg	Arg	Val	Phe	Asp	Lys	Tyr	Met	Thr	Ile	
			195					200					205				
10	Ser	Gly	Phe	Gln	Ile	Glu	Glu	Thr	Ile	Asp	Arg	Glu	Thr	Ser	Gly	Asp	
		210					215					220					
	Leu	Glu	Lys	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Val	Lys	Cys	Ile	Arg	Ser	Val	Pro	
15	225					230					235					240	
	Ala	Tyr	Phe	Ala	Glu	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Ser	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	
					245					250					255		
	Asp	Asp	Asp	Thr	Leu	Ile	Arg	Val	Met	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp	
				260					265					270			
	Leu	Leu	Asp	Ile	Arg	His	Glu	Phe	Arg	Lys	Asn	Phe	Ala	Lys	Ser	Leu	
			275					280					285				
25	Tyr	Gln	Met	Ile	Gln	Lys	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr	Arg	Lys	Ala	Leu	
		290					295					300					
	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Gly	Asp	Asp	Glu								
30	305					310											

Patentansprüche

1. Medikament zur Tumorthherapie, bei dem in einer wirksamen
Konzentration ein erstes und ein zweites Molekül enthalten
5 sind, wobei das erste Molekül

a1) Annexin V oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül,
oder

10 a2) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weit
gehend ähnlichen Moleküls ist,

und wobei das zweite Molekül

15 b1). ein Cytokin oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül
oder

20 b2) ein wirksames Fragment eines Cytokins oder des damit
weit gehend ähnlichen Moleküls ist.

2. Medikament nach Anspruch 1, wobei die Aminosäuresequenz
des ersten Moleküls der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1
oder Nr. 2 entspricht oder zumindest zu 50%, vorzugsweise zu-
mindest zu 60%, besonders bevorzugt zu zumindest 70%, ganz
besonders bevorzugt zumindest zu 80%, identisch damit ist.

3. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wo-
30 bei das Annexin V nicht-humanes Annexin V ist.

4. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wo-
bei das nicht-humane Annexin V das Annexin V des Huhns ist.

5. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Cytokin aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Interleukin-2, Interleukin-6, Interleukin-7, Interleukin-12 oder GM-CSF.

5

6. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei 0,05 bis 0,5 mg/g_{Tumorgewicht} an erstem Molekül in einer Verabreichungseinheit enthalten sind.

10

7. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Verabreichungseinheit 0,1 bis 2,5 mg, vorzugsweise 0,5 bis 2,0 mg, an erstem Molekül enthält.

15

8. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Verabreichungseinheit 50.000 bis 1.000.000 International Units, vorzugsweise 300.000 bis 750.000 International Units, an zweitem Molekül enthält.

20

9. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das erste und das zweite Molekül in einer Injektionsflüssigkeit, vorzugsweise einer gepufferten Kochsalzlösung, aufgenommen sind.

25

10. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Volumen der Injektionsflüssigkeit 0,5 bis 50 ml, vorzugsweise 1 bis 10 ml, beträgt.

30

11. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen umfasst.

12. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei es weiterhin menschliche Tumorzellen umfasst.

13. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Tumorzellen apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen des zu behandelnden Tumors sind.

5 14. Medikament nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Tumorzellen mit dem Protein in Kontakt sind.

15. Verwendung eines ersten Moleküls, nämlich

10 a1) Annexin V oder eines damit weit gehend ähnlichen Moleküls

oder

15 a2) eines wirksamen Fragments von Annexin V oder des damit weit gehend ähnlichen Moleküls,

in Kombination mit einem zweiten Molekül, nämlich

20 b1) einem Cytokin oder einem damit weit gehend ähnlichen Molekül

oder

25 b2) einem wirksamen Fragment eines Cytokins oder des damit weit gehend ähnlichen Moleküls,

zur Tumorthherapie.

30 16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei der Tumor ein Tumoriguss ist.

17. Verwendung nach Anspruch 15 oder 16, wobei der Tumor ein Mammakarzinom ist.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 17, wobei die Aminosäuresequenz des ersten Moleküls der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 1 oder Nr. 2 entspricht oder zumindest zu 50%, vorzugsweise zumindest zu 60%, besonders bevorzugt zu zumindest 70%, ganz besonders bevorzugt zumindest zu 80%, identisch damit ist.

19. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 18, wobei das Annexin V nicht-humanes Annexin V ist.

20. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 19, wobei das nicht-humane Annexin V das Annexin V des Huhns ist.

21. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 20, wobei das Cytokin aus der folgenden Gruppe ausgewählt ist: Interleukin-2, Interleukin-6, Interleukin-7, Interleukin-12 oder GM-CSF.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 21, wobei 0,05 bis 0,5 mg/g Tumorgewicht an erstem Molekül V in einer Verabreichungseinheit enthalten ist.

23. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 22, wobei eine Verabreichungseinheit 0,1 bis 2,5 mg, vorzugsweise 0,5 bis 2,0 mg, an erstem Molekül enthält.

24. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 23, wobei eine Verabreichungseinheit 50.000 bis 1.000.000 International Units, vorzugsweise 300.000 bis 750.000 International Units, an zweitem Molekül enthält.

25. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 24, wobei das erste und das zweite Molekül in einer Injektionsflüssigkeit, vorzugsweise einer gepufferten Kochsalzlösung, aufgenommen sind.

26. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 25, wobei das Volumen der Injektionsflüssigkeit 0,5 bis 50 ml, vorzugsweise 1 bis 10 ml, beträgt.

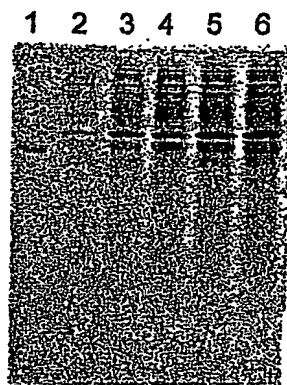
5 27. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 26, wobei es apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen umfasst.

28. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 27, wobei es weiterhin menschliche Tumorzellen umfasst.

10

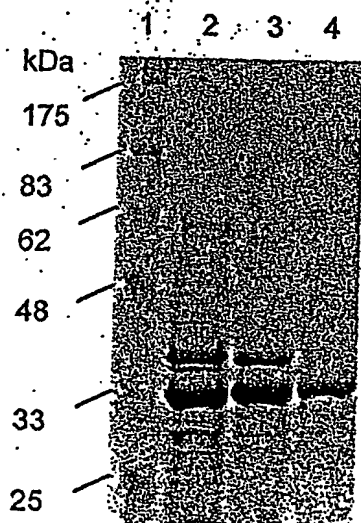
29. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 28, wobei die Tumorzellen apoptotische und/oder nekrotische Tumorzellen des zu behandelnden Tumors sind.

15 30. Verwendung nach einem der Ansprüche 15 bis 29, wobei die Tumorzellen mit dem Protein in Kontakt sind.



Spur 1: cAnxV als Referenz
 Spur 2: Zelllysate nach 4 h Wachstum
 Spur 3: Zelllysate nach 6 h Wachstum
 Spur 4: Zelllysate nach 7 h Wachstum
 Spur 5: Zelllysate nach 8 h Wachstum
 Spur 6: Zelllysate nach 16 h Wachstum

Fig. 1



Spur 1: Standard
 Spur 2: Q-Sepharose ff
 Spur 3: Resource S
 Spur 4: Superdex 200 pg

Fig. 2

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Medikament zur Tumorthherapie, bei dem in einer wirksamen Konzentration ein erstes und ein zweites Molekül enthalten sind, wobei das erste Molekül

a1) Annexin V oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül,

oder

a2) ein wirksames Fragment von Annexin V oder des damit weit gehend ähnlichen Moleküls ist,

und wobei das zweite Molekül

b1) ein Cytokin oder ein damit weit gehend ähnliches Molekül

oder

b2) ein wirksames Fragment eines Cytokins oder des damit weit gehend ähnlichen Moleküls ist.